

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
18. Juli 2002 (18.07.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/055692 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C12N 15/11**,  
A61K 31/713, C12N 15/88, A61P 35/00

91054 Erlangen (DE). **SCHUPPAN, Detlef** [DE/DE];  
Baumzeit 2, 91088 Bubenreuth (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/00151

(74) **Anwalt: GASSNER, Wolfgang**; Nägelsbachstrasse 49 a,  
91052 Erlangen (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
9. Januar 2002 (09.01.2002)

(81) **Bestimmungsstaaten (national)**: AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
101 00 586.5 9. Januar 2001 (09.01.2001) DE

(84) **Bestimmungsstaaten (regional)**: ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,  
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),  
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) **Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): RIBOPHARMA AG** [DE/DE]; Universitätsstrasse  
30, 95447 Bayreuth (DE).

(72) **Erfinder; und**

(75) **Erfinder/Anmelder (nur für US): KREUTZER, Roland**  
[DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).  
**LIMMER, Stefan** [DE/DE]; Universitätsstrasse 30,  
95447 Bayreuth (DE). **VORNLOCHER, Hans-Peter**  
[DE/DE]; Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE).  
**HADWIGER, Philipp** [DE/DE]; Universitätsstrasse  
30, 95447 Bayreuth (DE). **GEICK, Anke** [DE/DE];  
Universitätsstrasse 30, 95447 Bayreuth (DE). **OCKER,**  
**Matthias** [DE/DE]; Beethovenstr. 15, 91052 Erlangen  
(DE). **HEROLD, Christoph** [DE/DE]; Spardofer Str. 40,

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu  
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) **Title: METHOD FOR INHIBITTING THE EXPRESSION OF A TARGET GENE AND MEDICAMENT FOR TREATING A  
TUMOR DISEASE**

(54) **Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINES ZIELGENS UND MEDIKAMENT ZUR THE-  
RAPIE EINER TUMORERKRANKUNG**

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for inhibiting an expression of at least one target gene that impedes or prevents the  
apoptosis of a tumor cell, whereby at least one double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) is introduced into the tumor cell whose  
strand S1 has a region, which is complementary to the target gene at least in areas and which is comprised of fewer than 25 consecutive  
nucleotides.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung einer die Apoptose einer Tumorzelle hemmenden  
oder verhindernden Expression mindestens eines Zielgens, wobei mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in  
die Tumorzelle eingeführt wird, deren einer Strang S1 einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären aus weniger  
als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden Bereich aufweist.

WO 02/055692 A2

**Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens und Medikament zur Therapie einer Tumorerkrankung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Hemmung der Expression mindestens eines Zielgens in einer Zelle sowie ein Medikament zur Therapie einer Tumorerkrankung.

Aus der WO 99/32619 ist ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens mittels einem doppelsträngigen Oligoribonukleotid bekannt. Das bekannte Verfahren zielt auf die Hemmung der Expression von Genen in Zellen von Invertebraten ab. Dazu ist es erforderlich, daß das doppelsträngige Oligoribonukleotid eine zum Zielgen identische Sequenz mit einer Länge von mindestens 25 Basen aufweist.

Ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle sowie ein Medikament sind aus der WO 00/44895 bekannt. Bei dem Verfahren wird ein Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur (dsRNA) in die Zelle eingeführt. Ein Strang der dsRNA weist einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären aus höchstens 49 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaaren bestehenden Bereich auf. Das Medikament enthält mindestens eine dsRNA zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementär ist.

Aus Gautschi O. et al. (2001), J Natl Cancer Inst 93, Seiten 463 bis 471 ist es bekannt, daß eine erhöhte Expression der anti-apoptotisch wirkenden Proteine Bcl-2 und Bcl-xL an der Entwicklung und dem Fortschreiten vieler Tumore beteiligt ist. In Nacktmäusen erzeugte in vivo-Daten belegen, daß mit einer kombinierten Behandlung mit gegen die Expression von Bcl-2- und Bcl-xL-Genen gerichteten einzelsträngigen Anti-

sinn-Oligonukleotiden ein Wachstum von Tumoren um etwa 50 bis 60% verringert werden konnte. Dazu war eine Behandlung mit 20 mg Oligonukleotiden pro Kilogramm Körpergewicht und Tag erforderlich. Durch diese große Menge erforderlicher Oligonukleotide ist die Behandlung verhältnismäßig teuer. Darüber hinaus können die eingesetzten einzelsträngigen Oligonukleotide schnell im Serum abgebaut werden. Die hohe Oligonukleotidmenge ist erforderlich, weil ein Antisinn-Oligonukleotid letztendlich in einer Menge in Zielzellen eingebracht werden muß, die mindestens genauso groß ist wie die Menge der dort vorhandenen mRNA des Zielgens. Mit dem Verfahren wurde lediglich eine Verringerung des Wachstums, nicht jedoch eine Rückbildung der Tumore erreicht.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein Verfahren und ein Medikament angegeben werden, mit dem die Vermehrung von Tumorzellen effektiv und kostengünstig gehemmt werden kann.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 13 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüchen 2 bis 12 und 14 bis 26.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Hemmung einer die Apoptose einer Tumorzelle hemmenden oder verhindernden Expression mindestens eines Zielgens vorgesehen, wobei mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) in die Tumorzelle eingeführt wird, deren einer Strang S1 einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären, aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden Bereich aufweist. Unter dem "Zielgen" wird der DNA-Strang der doppelsträngigen DNA in der Tumorzelle verstanden, welcher

komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließlich aller transkribierten Bereiche ist. Bei dem Zielgen handelt es sich also im allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression des Zielgens gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Ribonukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA müssen Watson-Crick-Basenpaarungen aufweisen. Insbesondere einzelne nicht komplementäre Basenpaare beeinträchtigen das Verfahren kaum oder gar nicht. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenen Strang. Unter "eingeführt werden" wird das Aufnehmen in die Zelle verstanden. Das Aufnehmen kann durch die Zelle selbst erfolgen. Es kann aber auch durch Hilfsstoffe oder Hilfsmittel vermittelt werden.

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß mit diesem Verfahren die Vermehrung von Tumorzellen mit einer erheblich geringeren Menge an Oligoribonukleotiden gehemmt werden kann, als Oligonukleotide zum Erzielen eines vergleichbaren Ergebnisses bei der herkömmlichen Antisinn-Technik erforderlich sind. Darüber hinaus ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, in einer Population von Tumorzellen in einem solchen Ausmaß Apoptosen auszulösen, daß nicht nur das Wachstum der Population, sondern die Gesamtzahl der Tumorzellen verringert wird. Bei Durchführung des Verfahrens mit normalen, d.h. nicht transformierten, Zellen bewirkt das Verfahren gegenüber einem mit einer Kontroll-dsRNA durchgeführten Verfahren keine signifikante Erhöhung der Apoptoserate. Die Kontroll-dsRNA ist eine dsRNA, welche keinen zu einem in den Zellen vorkommenden Gen komplementären Strang aufweist.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist. Eine solche dsRNA weist gegenüber einer dsRNA ohne einzelsträngige Überhänge an mindestens einem Ende eine bessere Wirksamkeit bei der Hemmung der Expression des Zielgens auf. Ein Ende ist dabei ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dabei jeweils von einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet.

Vorzugsweise befindet sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1. Diese Lokalisation des einzelsträngigen Überhangs führt zu einer weiteren Steigerung der Effizienz des Verfahrens. In einem Ausführungsbeispiel weist die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang auf. Das andere Ende ist bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Eine solche dsRNA hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blutserum als besonders beständig erwiesen.

Der komplementäre Bereich der dsRNA kann 19 bis 24, vorzugsweise 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweisen. Eine dsRNA mit dieser Struktur ist besonders effizient in der Inhibition des Zielgens. Der Strang S1 der dsRNA kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweisen. Die Zahl dieser Nukleotide

ist zugleich die Zahl der in der dsRNA maximal möglichen Basenpaare.

Mindestens ein Ende der dsRNA kann modifiziert werden, um einem Abbau in der Tumorzelle oder einer Dissoziation der doppelsträngigen Struktur entgegenzuwirken. Weiterhin kann der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht werden. Die chemische Verknüpfung kann durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet werden. Sie kann auch durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet werden.

In einer bevorzugten Ausgestaltung des Verfahrens ist das Zielgen mindestens ein Gen der Bcl-2-Familie, insbesondere Bcl-2, Bcl-w oder Bcl-xL. Es ist auch möglich, daß mehrere Gene Zielgene sind. So können sowohl Bcl-2 als auch Bcl-xL Zielgene sein. Die Hemmung der Gene der Bcl-2-Familie ist besonders günstig, weil deren verstärkte Expression mit der Entwicklung und der Vermehrung vieler Tumorzellen in Zusammenhang steht. Die Hemmung mehrerer Zielgene ist vorteilhaft, weil es Tumorzellen gibt, welche mehrere anti-apoptotisch wirkende Gene exprimieren.

Vorzugsweise besteht die dsRNA aus einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll. Eine solche dsRNA ist in der Hemmung der Expression des Zielgens Bcl-2 besonders wirksam. Bei der

Tumorzelle kann es sich um eine Pankreaskarzinomzelle handeln. Zum Einbringen der dsRNA in die Tumorzelle kann eine die dsRNA umschließende micellare Struktur, vorzugsweise ein Liposom, oder ein die dsRNA umschließendes Kapsid verwendet werden. Das Kapsid kann insbesondere ein virales natürliches Kapsid oder ein auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestelltes künstliches Kapsid oder eine davon abgeleitete Struktur sein.

- 10 Weiterhin betrifft die Erfindung ein Medikament zur Therapie einer Tumorerkrankung, das mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Hemmung einer Expression mindestens eines Zielgens enthält, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären
- 15 aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden Bereich aufweist. Das Zielgen ist dabei ein Gen, dessen Expression eine Apoptose von Tumorzellen hemmt oder verhindert. Das Medikament ist so zu dosieren, daß die Hemmung der Expression mindestens eines Zielgens erreicht werden kann.
- 20 Überraschenderweise hat sich gezeigt, daß ein solches Medikament dazu sehr niedrig dosiert eingesetzt werden kann. Eine Dosierung von 5 mg dsRNA pro Kilogramm Körpergewicht und Tag sind ausreichend, um in den Tumorzellen eine Hemmung oder vollständige Unterdrückung der Expression des Zielgens zu erreichen. Bei einer solch niedrigen Dosierung werden Nebenwirkungen weitgehend ausgeschlossen.

Vorzugsweise weist zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf. Der einzelsträngige Überhang kann

30 sich am 3'-Ende des Strangs S1 befinden. Besonders bevorzugt weist die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang

auf. Es hat sich herausgestellt, daß eine solche dsRNA im Körper besonders beständig ist. Sie wird in Blut langsamer abgebaut bzw. ausgeschieden als eine dsRNA mit einzelsträngigen Überhängen an beiden Enden. Dadurch ist eine niedrige Dosierung möglich.

Der komplementäre Bereich kann 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweisen. Der Strang S1 kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweisen. Bei einer Ausführungsform ist mindestens ein Ende der dsRNA modifiziert, um einem Abbau in den Tumorzellen oder einer Dissoziation entgegenzuwirken. Der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur kann durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht sein.

Das Zielgen ist vorzugsweise mindestens ein Gen der Bcl-2-Familie, insbesondere Bcl-2, Bcl-w oder Bcl-xL. Besonders effizient ist ein Medikament, welches eine sowohl für das Zielgen Bcl-2 als auch für das Zielgen Bcl-xL spezifische dsRNA aufweist.

Die dsRNA kann aus einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll bestehen. Die mit dem Medikament zu behandelnde Tumorerkrankung kann ein Pankreaskarzinom sein. Für das Pankreaskarzinom existiert bislang keine ausreichend erfolgreiche Therapie. Die 5-Jahres Überlebensrate liegt bei circa 3% und ist die niedrigste aller Karzinome. Die dsRNA kann in dem Medikament in einer Lösung oder von einer micellaren Struktur, vor-



8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der dsRNA durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.
- 5 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen mindestens ein Gen der Bcl-2-Familie, insbesondere Bcl-2, Bcl-w oder Bcl-xL, ist oder sowohl Bcl-2 als auch Bcl-xL Zielgene sind.
- 10 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA aus einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
- 15 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Tumorzelle eine Pankreaskarzinomzelle ist.
- 20 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA mittels einer die dsRNA umschließenden micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder eines die dsRNA umschließenden Kapsids, in die Tumorzelle eingebracht wird.
- 25 13. Medikament zur Therapie einer Tumorerkrankung enthaltend mindestens eine doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Hemmung einer die Apoptose von Tumorzellen hemmenden oder verhindernden Expression mindestens eines Zielgens, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen zumindest abschnittsweise komplementären aus weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotiden bestehenden Bereich aufweist.

14. Medikament nach Anspruch 13, wobei zumindest ein Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
15. Medikament nach Anspruch 13 oder 14, wobei sich der einzelsträngige Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.
16. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 15, wobei die dsRNA nur an einem, insbesondere dem am 3'-Ende des Strangs S1 gelegenen, Ende einen einzelsträngigen Überhang aufweist.
17. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 16, wobei der komplementäre Bereich 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, insbesondere 22, Nukleotide aufweist.
18. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 17, wobei der Strang S1 weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21 bis 24, Nukleotide aufweist.
19. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 18, wobei mindestens ein Ende der dsRNA modifiziert ist, um einem Abbau in den Tumorzellen oder einer Dissoziation entgegenzuwirken.
20. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 19, wobei der durch komplementäre Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der dsRNA durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.
21. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 20, wobei das Zielgen mindestens ein Gen der Bcl-2-Familie, insbesondere Bcl-2, Bcl-w oder Bcl-xL, ist oder sowohl Bcl-2 als auch Bcl-xL Zielgene sind.

22. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 21, wobei die  
dsRNA aus einem Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 1  
und dem Strang S1 mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 oder einem  
Strang S2 mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 und dem Strang S1  
5 mit der Sequenz SEQ ID NO: 4 gemäß dem anliegenden Sequenzprotokoll besteht.
23. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 22, wobei die  
Tumorerkrankung ein Pankreaskarzinom ist.
24. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 23, wobei die  
10 dsRNA in dem Medikament in einer Lösung oder von einer  
micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, oder einem Kapsid umschlossen vorliegt.
25. Medikament nach einem der Ansprüche 13 bis 24, wobei das  
Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation,  
15 oralen Aufnahme oder Injektion, insbesondere zur intravenösen oder intraperitonealen Injektion oder zur Injektion direkt in ein Tumorgewebe, geeignet ist.
26. Medikament nach Anspruch 25, wobei die Zubereitung aus  
einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere  
20 einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

1/3

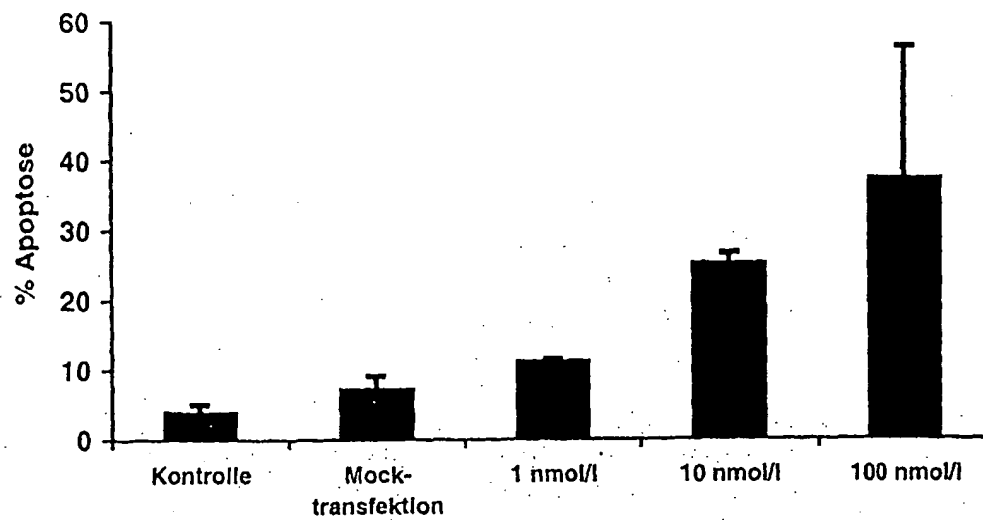


Fig. 1

2/3

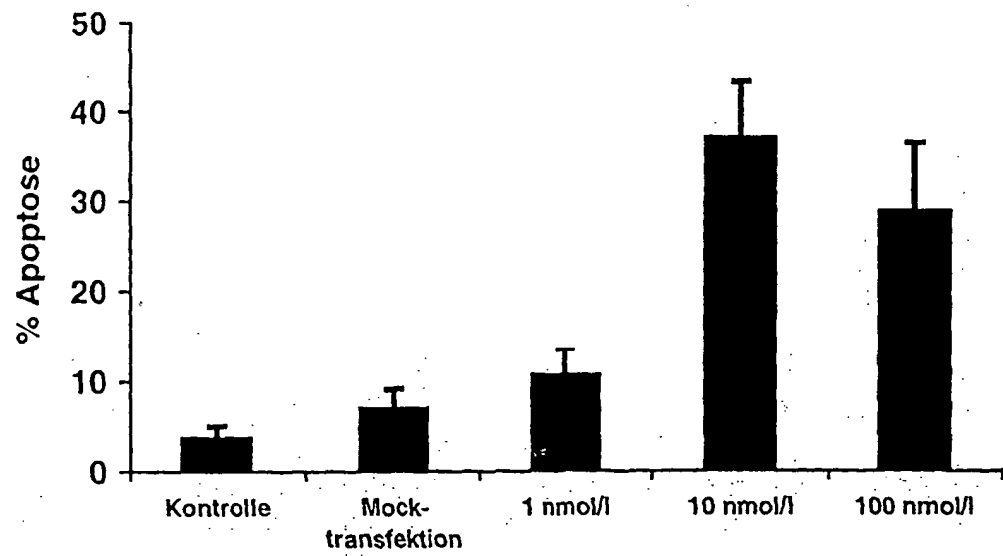


Fig. 2

**WO 02/055692**

**PCT/EP02/00151**

TRANSLATION FROM GERMAN

World Intellectual Property Organization  
World Patent Office

International Application Published in Accordance with Patent Cooperation Treaty (PCT)

- (43) International Disclosure Date: July 18, 2002  
(10) International Disclosure No.: **WO 02/055692 A2**
- 
- (51) Int. Cl<sup>7</sup>: C12N 15/11, A61K 31/713, C12N 15/88, A61P 35/00  
(21) International Application No. PCT/EP02/00151  
(22) International Application Date: January 9, 2002  
(25) Submission Language: German  
(26) Publication Language: German  
(30) Priority Right Data: Application No. 101 00 586.5, January 9, 2001, Germany  
(71) Applicant (for all designated countries except U.S.A.):  
Ribopharma AG, Bayreuth, Germany  
(72) Inventor; and  
(75) Inventor/Applicant (for U.S.A. only)  
Roland Kreutzer, Bayreuth, Germany  
Stefan Limmer, Bayreuth, Germany  
Hans-Peter Vornlocher, Bayreuth, Germany  
Philipp Hadwiger, Bayreuth, Germany  
Anke Geick, Bayreuth, Germany  
Matthias Ocker, Erlangen, Germany  
Christoph Herold, Erlangen, Germany  
Detlef Schuppan, Bubenreuth, Germany  
(74) Agent: Wolfgang Gassner, Erlangen, Germany  
(81) Designated Countries (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.  
(84) Designated Countries (regional): ARIPO Patents (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian Patents (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patents (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI Patents (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

Without International Search Report and republished on receipt of the report.

*Concerning the two letter codes and other abbreviations, refer to "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" found at the beginning of each ordinary issue of the PCT Gazette.*

---

(54) Title:    **Method for Inhibiting the Expression of a Target Gene and Medicament for Treating a Tumor Disease**

(57) Abstract:       The invention relates to a method for inhibiting an expression of at least one target gene that impedes or prevents the apoptosis of a tumor cell, whereby at least one double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) is introduced into the tumor cell whose strand S1 has a region, which is complementary to the target gene at least in areas and which is comprised of fewer than 25 consecutive nucleotides.



## **Method for Inhibiting the Expression of a Target Gene and Medicament for Treating a Tumor Disease**

The invention concerns a method for inhibition of expression of at least one target gene in a cell, as well as a medicament for therapy of a tumor disease.

A method for inhibition of expression of the target gene by means of a double-strand oligoribonucleotide is known from WO 99/32619. The known method is geared toward inhibition of expression of genes and cells in invertebrates. To do this it is necessary that the double strand oligoribonucleotide have a sequence identical to the target gene with a length of at least 25 bases.

A method for inhibition of expression of the target in a cell as well as a medicament, are known from WO 00/44895. In the method an oligoribonucleotide with a double-strand structure (dsRNA) is introduced to the cell. One strand of the dsRNA has a region consisting of at least 49 consecutive nucleotide pairs complementary at least in areas to the target gene. The medicament contains at least one dsRNA to inhibit expression of a stipulated target gene in which one strand of the dsRNA is complementary to the target gene at least in areas.

It is known from O. Gautschi et al. (2001), J. Natl. Cancer Inst. 93, pp. 463 to 471, that increased expression of antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL participates in the development and progress of many tumors. In vivo data produced in hairless mice demonstrates that with combined treatment with antisense oligonucleotides directed against expression of the Bcl-2 and Bcl-xL genes, growth of tumors could be reduced by about 50 to 60%. Treatment with 20 mg oligonucleotides per kilogram of body weight and day were necessary for this. The treatment is relatively expensive because of this large amount of required oligonucleotides. Moreover, the employed single-strand oligonucleotides can be rapidly broken down into serum. A high amount of oligonucleotide is required, because an antisense oligonucleotide must ultimately be inserted into the target cells in an amount that is at least as great as the amount of mRNA of the target gene present there. Only a reduction of growth, but not regression of the tumor was achieved with the method.

The task of the present invention is to eliminate the drawbacks according to the prior art. In particular, a method and medicament are to be offered with which reproduction of tumor cells can be effectively and cost effectively inhibited.

This task is solved by the features of Claim 1 and 13. Advantageous embodiments are apparent from Claims 2 to 12 and 14 to 26.

According to the invention, a method for inhibition of at least one target gene that inhibits or prevents apoptosis of a tumor cell is prescribed in which at least one double strand ribonucleic acid (dsRNA) is inserted into the tumor cell, one strand S1 of which has a region consisting of less than 25 consecutive nucleotides that are complementary at least in areas to the target gene. "Target gene" is understood to mean the DNA strand of the double-strand DNA in the tumor cell that is complementary to a DNA strand, including all transcribed regions serving as matrix during transcription. The target gene is therefore generally the sense-strand. The strand S1 can therefore be complementary to an RNA transcript or its processing product, like mRNA formed during expression of the target gene. A dsRNA is present when the ribonucleic acid consisting of one of two ribonucleic acid strands as a double-strand structure. Not all nucleotides of dsRNA need exhibit Watson-Crick base pairings. In particular, individual noncomplementary base pairs hardly have an adverse effect on the method or none at all. The maximum possible number of base pairs is the number of nucleotides in the shortest strand contained in the dsRNA. "Are inserted" is understood to mean absorption into the cell. Absorption can occur by the cell itself. However, it can also be mediated by auxiliary substances or agents.

It has surprisingly been demonstrated that reproduction of tumor cells can be inhibited with this method with a significantly smaller amount of oligoribonucleotides than the oligonucleotides required to achieve comparable results in the usual antisense technique. In addition, it is possible for the method according to the invention to initiate apoptoses in a population of tumor cells to an extent that not only growth of the population, but the total number of tumor cells is reduced. During performance of the method with normal, i.e., untransformed cells, the method causes no significant increase in apoptosis rate in comparison with a method conducted with a control dsRNA. The control dsRNA is a dsRNA having no strand complementary to a gene occurring in the cell.

It has proven particularly advantageous that at least one end of the dsRNA has a single-strand overhang formed from 1 to 4, especially 2 or 3, nucleotides. Such dsRNA has better effectiveness in inhibiting expression of the target gene relative to a dsRNA without single-strand overhangs on at least one end. An end is a region of the dsRNA in which a 5' and a 3' strand end occur. A dsRNA consisting only of strand S1 therefore has a loop structure on only one end. A dsRNA formed from a strand S1 and a strand S2 has two ends. One end is then formed from a strand end on the strand S1 and one on strand S2.

Preferably the single-strand overhang is situated on the 3' end of strand S1. This localization of the single-strand overhang leads to a further increase in efficiency of the method. In a practical example, the dsRNA has a single-strand overhang only on one end, especially the end situated on the 3' end of strand S1. The other end is smooth in a dsRNA having two ends,

i.e., without overhangs. Such dsRNA has proven to be particularly resistant both in different cell culture media and in blood serum.

The complementary region of dsRNA can have 19 to 24, preferably 21 to 23, especially 22, nucleotides. A dsRNA with this structure is particularly efficient in inhibition of the target gene. Strand S1 of the dsRNA can have less than 30, preferably less than 25, especially 21 to 24, nucleotides. The number of these nucleotides is simultaneously the number of maximum possible base pairs in the dsRNA.

At least one end of the dsRNA can be modified in order to counteract degradation in a tumor cell or disassociation of the double-strand structure. The cohesion of the double strand structure caused by the complementary nucleotide pairs is increased by at least one, preferably two, additional chemical links. The chemical link can be formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bridge bond, hydrophobic interactions, preferably van der Waals or stacking interactions or by metal-ion coordination. It can also be formed by purine analogs used in the double-strand structure instead of purine.

In a preferred embodiment of the method, the target gene is at least one gene of the Bcl-2 family, especially Bcl-2, Bcl-2 or Bcl-xL. It is also possible that several genes are target genes. Thus, both Bcl-2 and Bcl-xL can be target genes. Inhibition of the genes of the Bcl-2 family is particularly favorable because their increased expression is connected with development and reproduction of many tumor cells. Inhibition of several tumor genes is advantageous, because there are tumor cells that express several antiapoptotic genes.

The dsRNA preferably consists of a strand S2 with the sequence SEQ ID NO: 1 and the strand S1 with the sequence SEQ ID NO: 2 or a strand S2 with the sequence SEQ ID NO: 3 and the strand S1 with the sequence SEQ ID NO: 4 according to the accompanying sequence protocol. Such dsRNA is particularly effective in inhibition of expression of the target gene Bcl-2. The tumor cell can be pancreatic carcinoma cell. A micellar structure, preferably a liposome or a capsid enclosing the dsRNA, can be used to incorporate the dsRNA in the tumor cell. The capsid, in particular, can be a viral natural capsid or an artificial capsid produced chemically or enzymatically, or a structure derived from it.

The invention also concerns a medicament for therapy of the tumor disease that contains at least one double-strand ribonucleic acid (dsRNA) for inhibition of expression of at least one target gene, in which one strand S1 of the dsRNA has a region consisting of less than 25 consecutive nucleotides complementary to the target gene at least in areas. The target gene is then a gene whose expression inhibits or prevents apoptosis of tumor cells. The medicament is to be dosed so that inhibition of expression of at least one target gene can be achieved. It has surprisingly been shown that such a medicament can be used for this purpose in a very low dose.

A dosage of 5 mg dsRNA per kilogram of body weight and day is sufficient in order to achieve inhibition or complete suppression of expression of the target gene in the tumor cells. At such a low dose, side effects are largely ruled out.

At least end of the dsRNA preferably has a single strand overhang formed from 1 to 4, especially 2 or 3, nucleotides. The single strand overhang can be situated on the 3' end of strand S1. The dsRNA with particular preference has a single-strand overhang only on one end situated especially on the 3' end of strand S1. It has turned out that such dsRNA is particularly stable in the body. It is broken down or excreted in the blood more slowly than dsRNA with single-strand overhangs on both ends. A low dose is possible on this account.

The complementary region can have 19 to 24, preferably 21 to 23, especially 22, nucleotides. Strand S1 can have less than 30, preferably less than 25, especially 21 to 24, nucleotides. In one variant at least one end of the dsRNA is modified in order to counteract breakdown in the tumor cells or dissociation. The cohesion caused by complementary nucleotide pairs of the double-strand structure can be increased by at least one, preferably two additional chemical links.

The target gene is preferably at least one gene of the Bcl-2 family, especially Bcl-2, Bcl-w or Bcl-xL. A medicament that has dsRNA specific both for the target gene Bcl-2 and for the target gene Bcl-xL is particularly efficient.

The dsRNA can consist of a strand S2 with the sequence SEQ ID NO: 1 and the strand S1 with the sequence SEQ ID NO: 2 or a strand S2 with the sequence SEQ ID NO: 3 and a strand S1 with the sequence SEQ ID NO: 4 according to the accompanying sequence protocol. The tumor disease being treated with the medicament can be a pancreatic carcinoma. No adequately successful therapy yet exists for pancreatic carcinoma. The five-year survival rate is about 3% and is the lowest of all carcinomas. The dsRNA can be present in the medicament in a solution or have a micellar structure, preferably a liposome, or be enclosed by a capsid. A micellar structure or capsid can facilitate uptake of the dsRNA in the tumor cells. The medicament can have a preparation that is suitable for inhalation, oral intake or injection, especially for intravenous or intraperitoneal injection or injection directly into tumor tissue. A preparation suitable for inhalation or injection can consist in the simplest case of a physiologically compatible buffer, especially a phosphate-buffered salt solution and the dsRNA. It has surprisingly turned out that a dsRNA dissolves only in such a buffer that is taken up by tumor cells and inhibits expression of the target gene without the dsRNA having to be packaged in a special vehicle.

Examples of the invention are explained below with reference to the figures. In the figures:

Figure 1 shows the percentage apoptosis rate of human pancreatic carcinoma cells YAP C 120 hours after transfection with a dsRNA 1 complementary to a first sequence from the human Bcl-2 gene,

Figure 2 shows the percentage of apoptosis rate of the YAP C cells 120 hours after transfection with a dsRNA 2 complementary to a second sequence from the human Bcl-2 gene and

Figure 3 shows the percentage of apoptosis rate of YAP C cells 120 hours after transfection with a dsRNA 3 complementary to a sequence from the neomycin-resistance gene.

Cells of the human pancreatic cell line YAP C, which can be obtained under No. ACC 382 from the German Collection of Microorganisms and Cell cultures, Braunschweig, were cultured under constant conditions of 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium (Biochrom, Berlin) with 10% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/ streptomycin. Human skin fibroblasts were cultivated under the same conditions in Dulbecco's MEM with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin.

The double-strand oligoribonucleotides used for transfection have the following sequences denoted in the sequence protocol with SEQ ID NO: 1 to SEQ ID NO: 6.

dsRNA 1, which is complementary to a first sequence from the human Bcl-2 gene:

S2: 5'- cag gac cuc gcc gcu gca gac c-3' (SEQ ID NO: 1)

S1: 3'-cg guc cug gag cgg cga cgu cug g-5' (SEQ ID NO: 2)

dsRNA 2, which is complementary to a second sequence from the human Bcl-2 gene

S2: 5'- g ccu uug ugg aac ugu acg gcc-3' (SEQ ID NO: 3)

S1: 3'-uac gga aac acc uug aca ugc cgg-5' (SEQ ID NO: 4)

dsRNA 3, which is complementary to the sequence from the neomycin-resistance gene:

S2: 5'- c aag gau gag gau cgu uuc gca-3' (SEQ ID NO: 5)

S1: 3'-ucu guc cua cuc cua gca aag cg -5' (SEQ ID NO: 6)

The transfections were conducted in a six-well plate with oligofectamine (Invitrogen, Karlsruhe). 250,000 cells were exposed per well. Transfection of the double-strand oligoribonucleotide was conducted according to the protocol recommended by Invitrogen for oligofectamine (data referred to one well of a six-well plate).

10 µL of double-strand oligoribonucleotide (0.1-10 µm) was diluted with 175 µL cell culture medium without additives: 3 µL oligofectamines were diluted with 12 µL cell culture medium without additives and incubated for 10 minutes at room temperature. The oligofectamines so diluted were introduced to the already diluted double-strand oligoribonucleotide, mixed and incubated for 20 minutes at room temperature. In this time the cells being transfected or washed once with cell culture medium without additives and 800 µL

fresh cell culture medium was added. 200  $\mu$ L of the described oligofectamine-dsRNA mixture per well was then added so that the final value for transfection was 1000  $\mu$ L. A final concentration of double-strand oligoribonucleotides of 1-100  $\mu$ M was obtained by this. The transfection charge was incubated for 4 hours at 37°C. 500  $\mu$ L cell culture medium with 30% FCS was then added per well. The final concentration of FCS was 10%. This charge is incubated for 120 hours at 37°C.

After incubation the supernatants are collected, the cells washed with phosphate-buffered salt solution (PBS), separated with trypsin and centrifuged for 10 minutes at 100 g. The supernatant was discarded and the pellet incubated with hypotonic propidium iodide solutions for 30 minutes at 4°C in the dark. Analysis occurred by flow cytometry in the fluorescence-assisted cell sorter FACSCalibur (BD GmbH, Heidelberg).

The double-strand oligoribonucleotides dsRNA 1 and dsRNA 2 reduce in addition of apoptosis mediated by Bcl-2 in the investigated human pancreatic carcinoma cells. To initiate or start up apoptosis, no additional stimulation of apoptosis is required. The apoptosis rate rose as a function of the incubation time. Figure 1 shows the result obtained with dsRNA 1 and Figure 2 the result obtained with dsRNA 2. Whereas untreated YAP C control cells and cells with which the described method for transfection was conducted without double-strand oligoribonucleotide (mock-transfected cells) had only 3.8% and 7.1% apoptosis after 120 hours of incubation, by transfection with 100 nm dsRNA, the apoptosis rate after 120 hours could be raised to 37.2% during transfection with dsRNA 1 and 28.9% during transfection with dsRNA 2. The control transfection with dsRNA 3 led to a maximum apoptosis rate of 13.5%. This does not represent a significant increase relative to the mock-transfected cells and demonstrates the sequence specificity of the effect of dsRNA 1 and 2.

For control, skin fibroblasts were also transfected as untransformed cells with the dsRNAs 1 and 2. These cells showed no significant increase in apoptosis rate after 120 hours.

## Claims

1. Method for inhibition of expression of at least one target gene that inhibits or prevents apoptosis of a tumor cell, in which at least one double-strand ribonucleic acid (dsRNA) is introduced to the tumor cell, whose one strand S1 has a region consisting of less than 25 consecutive nucleotides complementary to the target gene at least in areas.
2. Method according to Claim 1, in which at least one end of the dsRNA has a single strand overhang formed from 1 to 4, especially 2 or 3, nucleotides.
3. Method according to one of the preceding Claims, in which the single-strand overhang is situated on the 3' end of strand S1.
4. Method according to one of the preceding Claims, in which the dsRNA has a single-strand overhang only on one end, especially the 3' end of strand S1.
5. Method according to one of the preceding Claims, in which the complementary region of dsRNA has 19 to 24, preferably 21 to 23, especially 22, nucleotides.
6. Method according to one of the preceding Claims, in which strand S1 is less than 30, preferably less than 25, especially 21 to 24, nucleotides.
7. Method according to one of the preceding Claims, in which at least one end of the dsRNA is modified in order to counteract breakdown in the tumor cell or dissociation.
8. Method according to one of the preceding Claims, in which cohesion of the dsRNA caused by complementary nucleotide paths is increased by at least one, preferably two, additional chemical links.
9. Method according to one of the preceding Claims, in which the target gene is at least one gene of the Bcl-2 family, especially Bcl-2, Bcl-w or Bcl-xL or both Bcl-2 and Bcl-xL are target genes.
10. Method according to one of the preceding Claims, in which the dsRNA consists of a strand S2 with the sequence SEQ ID NO: 1 and the strand S1 with the sequence SEQ ID NO: 2 or a strand S2 with the sequence SEQ ID NO: 3 and the strand S1 with the sequence SEQ ID NO: 4 according to the enclosed sequence protocol.
11. Method according to one of the preceding Claims, in which the tumor cell is the pancreatic carcinoma cell.
12. Method according to one of the preceding Claims, in which the dsRNA is introduced to the tumor cell by means of a micellar structure enclosing the dsRNA, preferably a liposome, or a capsid enclosing the dsRNA.
13. Medicament for therapy of a tumor disease containing at least one double-strand ribonucleic acid (dsRNA) to inhibit expression of at least one target gene that inhibits or prevents

apoptosis of tumor cells, in which a strand S1 of the dsRNA has a region consisting of less than 25 consecutive nucleotides complementary to the target gene at least in areas.

14. Medicament according to Claim 13, in which at least one end of the dsRNA has a single-strand overhang formed from 1 to 4, especially 2 or 3, nucleotides.

15. Medicament according to Claim 13 or 14, in which the single-strand overhang is situated on the 3' end of strand S1.

16. Medicament according to one of the Claims 13 to 15, in which the dsRNA has a single-strand overhang only on one end, especially the 3' end of strand S1.

17. Medicament according to one of the Claims 13 to 16, in which the complementary region has 19 to 24, preferably 21 to 23, especially 22, nucleotides.

18. Medicament according to one of the Claims 13 to 17, in which strand S1 has less than 30, preferably less than 25, especially 21 to 24, nucleotides.

19. Medicament according to one of the Claims 13 to 18, in which at least one end of the dsRNA is modified in order to counteract degradation in the tumor cells or dissociation.

20. Medicament according to one of the Claims 13 to 19, in which the cohesion of the dsRNA caused by complementary nucleotide pairs is increased by at least one, preferably two, additional chemical links.

21. Medicament according to one of the Claims 13 to 20, in which the target gene is at least one gene of the Bcl-2 family, especially Bcl-2, Bcl-w or Bcl-xL or both Bcl-2 and Bcl-xL are target genes.

22. Medicament according to one of the Claims 13 to 21, in which the dsRNA consists of a strand S2 with the sequence SEQ ID NO: 1 and the strand S1 with the sequence SEQ ID NO: 2 or a strand S2 with the sequence SEQ ID NO: 3 and the strand S1 with the sequence SEQ ID NO: 4 according to the enclosed sequence protocol.

23. Medicament according to one of the Claims 13 to 22, in which the tumor disease is pancreatic carcinoma.

24. Medicament according to one of the Claims 13 to 23, in which the dsRNA is present in the medicament in a solution or is enclosed by a micellar structure, preferably a liposome or a capsid.

25. Medicament according to one of the Claims 13 to 24, in which the medicament has a preparation that is suitable for inhalation, oral intake or injection, especially for intravenous or intraperitoneal injection or for injection directly into tumor tissue.

26. Medicament according to Claim 25, in which the preparation consists of a physiologically compatible buffer, especially a phosphate-buffered salt solution, and the dsRNA.



Key to figs. 1-3: % Apoptosis; Control; Mock transfection

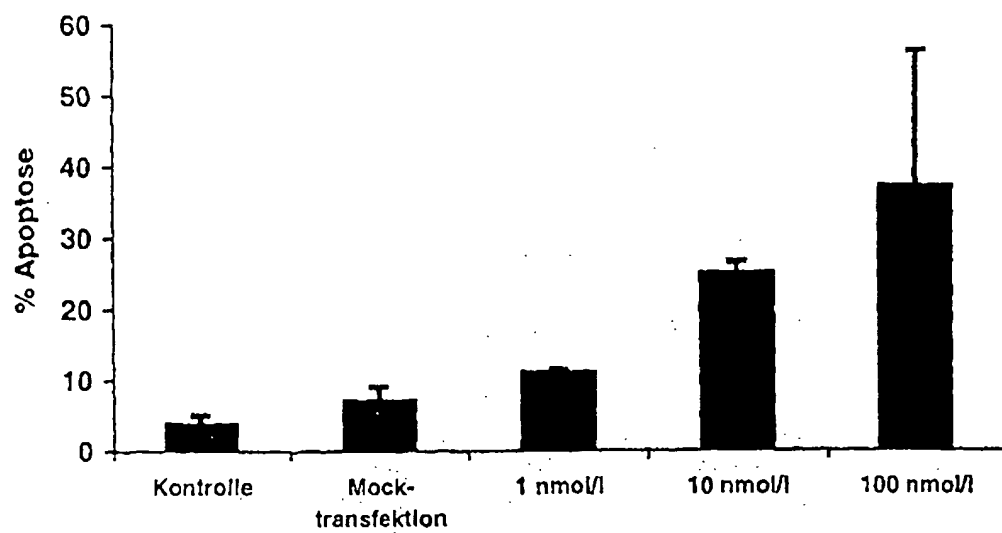


Fig. 1

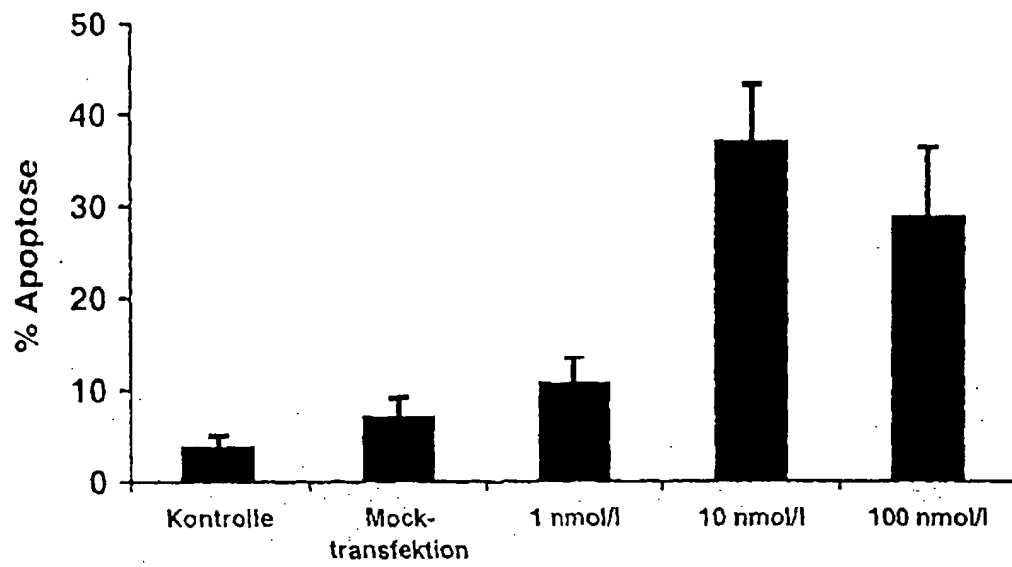


Fig. 2

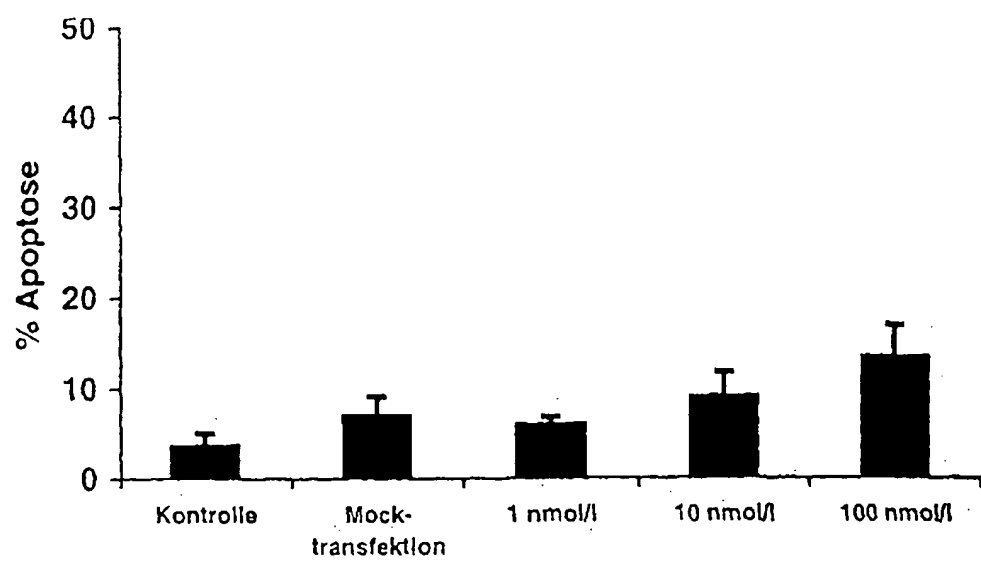


Fig. 3

## Sequence Protocol

<110> Ribopharma AG

<120> Tumor medicament

<130> 412012GA

<140>

<141>

<160> 6

<170> Patent In Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: sense strand of a dsRNA complementary to a sequence of the human Bcl-2 gene

<400> 1

caggaccucg ccgcugcaga cc

<210> 2

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: antisense strand of a dsRNA complementary to a sequence of the human Bcl-2 gene

<400> 2

ggucugcagc ggcgaggucc uggc

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: sense strand of a dsRNA complementary to a sequence of the human Bcl-2 gene

<400> 3

gccuuugugg aacuguacgg cc

<210> 4

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: antisense strand of a dsRNA complementary to a sequence of the human Bcl-2 gene

<400> 4

ggccguacag uuccacaaag gc au

<210> 5

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: sense strand of a dsRNA complementary to a sequence of the neomycin-resistance gene

<400> 5

caaggauag gaucguuucg ca

<210> 6

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: sense strand of a dsRNA complementary to a sequence of the neomycin-resistance gene

<400> 6

gcgaaacgau ccucauccug ucu